

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 9/16, 9/18, 1/15, C12P 21/02, C11B 3/00</p>	A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/31790</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 23. Juli 1998 (23.07.98)</p>		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/00081</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 8. Januar 1998 (08.01.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 197 01 348.1 16. Januar 1997 (16.01.97) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): RÖHM GMBH [DE/DE]; Kirschenallee, D-64293 Darmstadt (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LÖFFLER, Fridolin [DE/DE]; Karl-Henkelmann-Weg 4, D-64625 Bensheim (DE). JUNGSCHAFFER, Gerald [DE/DE]; Hähnleiner Strasse 1A, D-64665 Alsbach-Hähnlein (DE). KHANH, Quoc, Nguyen [DE/DE]; Am Tannenbergr 9, D-64385 Reichelsheim (DE). SCHUSTER, Erwin [DE/DE]; Darmstädter Strasse 237, D-64625 Bensheim-Auerbach (DE). SPRÖSSLER, Bruno [DE/DE]; Auf der Schmelz 93, D-64380 Roßdorf (DE). WOLF, Sabine [DE/DE]; Otzbergstrasse 44, D-64853 Otzberg (DE).</p> <p>(74) Anwalt: WEISERT, Annekäte; Kraus & Weisert, Thomas-Wimmer-Ring 15, D-80539 München (DE).</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/00081</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 8. Januar 1998 (08.01.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 197 01 348.1 16. Januar 1997 (16.01.97) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): RÖHM GMBH [DE/DE]; Kirschenallee, D-64293 Darmstadt (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LÖFFLER, Fridolin [DE/DE]; Karl-Henkelmann-Weg 4, D-64625 Bensheim (DE). JUNGSCHAFFER, Gerald [DE/DE]; Hähnleiner Strasse 1A, D-64665 Alsbach-Hähnlein (DE). KHANH, Quoc, Nguyen [DE/DE]; Am Tannenbergr 9, D-64385 Reichelsheim (DE). SCHUSTER, Erwin [DE/DE]; Darmstädter Strasse 237, D-64625 Bensheim-Auerbach (DE). SPRÖSSLER, Bruno [DE/DE]; Auf der Schmelz 93, D-64380 Roßdorf (DE). WOLF, Sabine [DE/DE]; Otzbergstrasse 44, D-64853 Otzberg (DE).</p> <p>(74) Anwalt: WEISERT, Annekäte; Kraus & Weisert, Thomas-Wimmer-Ring 15, D-80539 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/00081</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 8. Januar 1998 (08.01.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 197 01 348.1 16. Januar 1997 (16.01.97) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): RÖHM GMBH [DE/DE]; Kirschenallee, D-64293 Darmstadt (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LÖFFLER, Fridolin [DE/DE]; Karl-Henkelmann-Weg 4, D-64625 Bensheim (DE). JUNGSCHAFFER, Gerald [DE/DE]; Hähnleiner Strasse 1A, D-64665 Alsbach-Hähnlein (DE). KHANH, Quoc, Nguyen [DE/DE]; Am Tannenbergr 9, D-64385 Reichelsheim (DE). SCHUSTER, Erwin [DE/DE]; Darmstädter Strasse 237, D-64625 Bensheim-Auerbach (DE). SPRÖSSLER, Bruno [DE/DE]; Auf der Schmelz 93, D-64380 Roßdorf (DE). WOLF, Sabine [DE/DE]; Otzbergstrasse 44, D-64853 Otzberg (DE).</p> <p>(74) Anwalt: WEISERT, Annekäte; Kraus & Weisert, Thomas-Wimmer-Ring 15, D-80539 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>			
<p>(54) Title: PROTEIN WITH PHOSPHOLIPASE ACTIVITY</p> <p>(54) Bezeichnung: PROTEIN MIT PHOSPHOLIPASEAKTIVITÄT</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns a protein with phospholipase activity which is characterized in that it comprises the mature sequence of <i>Aspergillus</i> lysophospholipase or a sequence derived therefrom and can be cleaved at at least one point. In the event of cleavage, either the cleaved parts are bonded via at least one bond which can be cleaved under reduction conditions, or at least one of the non-cleaved parts has phospholipase activity. The invention further concerns a process for producing this protein by fermentation in a suitable culture medium of a host organism which produces lysophospholipase transformed in suitable manner and isolating the protein with phospholipase activity from the cell-free culture filtrate, fermentation being carried out in an acidic to slightly alkaline range.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft ein Protein mit Phospholipaseaktivität, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es die reife Sequenz der <i>Aspergillus</i>-Lysophospholipase oder eine davon abgeleitete Sequenz besitzt und an mindestens einer Stelle gespalten sein kann, wobei im Falle einer Spaltung die Spaltstücke entweder über mindestens eine unter reduzierenden Bedingungen spaltbare Bindung verknüpft sind, oder von den unverknüpften Spaltstücken mindestens eines Phospholipaseaktivität besitzt sowie ein Verfahren zur Produktion dieses Proteins durch Fermentation eines in geeigneter Weise transformierten Lysophospholipase produzierenden Wirtsorganismus in einem geeigneten Kulturmedium und Isolierung des Proteins mit Phospholipaseaktivität aus dem zellfreien Kulturfiltrat, wobei man die Fermentation im sauren bis leicht alkalischen Bereich durchführt.</p>				

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

PROTEIN MIT PHOSPHOLIPASEAKTIVITÄT

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Protein mit Phospholipaseaktivität, das die reife Sequenz der *Aspergillus*-Lysophospholipase oder eine davon abgeleitete Sequenz besitzt und an mindestens einer Stelle gespalten sein kann, wobei gegebenenfalls die Spaltstücke entweder über mindestens eine unter reduzierenden Bedingungen spaltbare Bindung verknüpft sind oder von den unverknüpften Spaltstücken mindestens eines Phospholipaseaktivität besitzt. Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Produktion dieses Proteins sowie die Verwendung dieses Proteins zur Entschleimung von pflanzlichen Ölen und als Backhilfsmittel.

Bei der Entschleimung von Speiseöl werden nicht hydratisierbare Phospholipide durch Phospholipase wasserlöslich gemacht und so schonend, kostensparend und umweltfreundlich aus dem Speiseöl entfernt. In der europäischen Patentanmeldung 0 513 709 (Röhm/Lurgi) wird erstmals ein wirksames enzymatisches Verfahren zur Entschleimung vorgestellt. Dabei wird ein mit Wasser vorentschleimtes Speiseöl mit einer wäßrigen Lösung einer Phospholipase zu Tröpfchen kleiner 10 μ m emulgiert. Nach der Hydrolyse (pH 3 bis 6, Temperatur 50 bis

- 2 -

70°C) wird die wäßrige Phase abgetrennt. Das enzymatische Entschleimungsverfahren wurde als "EnzyMax-Verfahren" von der Firma Lurgi in der Speiseölindustrie eingeführt. In der DE 43 39 556 wird als weitere Variante dieses Verfahrens die Wiederverwendung des Enzyms beschrieben, indem man das Enzym aus einer gebrauchten, schlammhaltigen wäßrigen Phase durch Zusatz von Tensiden oder Lösungsvermittlern ablöst und als weitgehend schlammfreie, enzymhaltige Lösung wiederverwendet.

Die Bereitstellung der erforderlichen Mengen an Enzym für die Betreibung eines großtechnischen Verfahrens kann nur mit Hilfe von Mikroorganismen gedeckt werden. Es besteht also ein Bedarf nach einer mikrobiellen Quelle, die erlaubt, das Enzym Phospholipase in unbeschränkten Mengen zu produzieren. In der DE-OS 195 27 274.9 vom 26.07.1995 (Röhm/Lurgi) wird beschrieben, daß in *Aspergillus niger* eine geeignete Phospholipase gefunden wurde. Sie spaltet Lecithin zu Lysolecithin, ist aber auch in der Lage Lysolecithin weiter zu spalten zum Phosphatidylcholin. Reine Lysophospholipasen aus *Aspergillus*, die nur Lysolecithin zu spalten vermögen, sind im Entschleimungsprozeß wirkungslos. Das gilt auch für die nicht acylspaltenden Phospholipasen C und D.

Ferner können Phospholipasen auch als Backhilfsmittel zur Verbesserung der Verarbeitung des Teigs verwendet werden.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine kostengünstige Phospholipase in hoher Reinheit herzustellen. Die Phospholipase soll durch einen transformierten Wirtsorganismus in großen Mengen produziert werden können. Mit dem Enzym sollen Präparate hergestellt werden können, die sich besonders gut zur Hydrolyse von Phospholipiden und somit zur Klärung von Stärkehydrolysaten und zur Herstellung von Backhilfsmitteln eignen.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe gelöst durch ein Protein mit Phospholipaseaktivität, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es die reife Sequenz der *Aspergillus*-Lysophospholipase oder eine davon abgeleitete Sequenz besitzt und an mindestens einer Stelle gespalten sein kann, wobei im Falle einer Spaltung die Spaltstücke entweder über mindestens eine unter reduzierenden Bedingungen spaltbare Bindung verknüpft sind oder von den unverknüpften Spaltstücken mindestens eines Phospholipaseaktivität besitzt. Ferner wird diese Aufgabe gelöst durch ein Protein mit Phospholipaseaktivität, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es von einem Antikörper gegen gereinigte Phospholipase aus *Aspergillus foetidus* RH 3046 erkannt wird.

Es wurde überraschenderweise gefunden, daß ein mit der aus *Aspergillus* isolierbaren Desoxyribonukleinsäure (DNA) gemäß der DE-OS 196 20 649.9 transformierter Mikroorganismus nicht nur eine Lysophospholipase codiert, sondern unter bestimmten Kulturbedingungen auch in eine Phospholipase prozessiert wird. Die Phospholipase besitzt somit die gleiche Primärstruktur wie die Lysophospholipase, jedoch eine andere Sekundär- und Tertiärstruktur und somit andere physiologische Eigenschaften. Die entsprechende Sequenz ist in SEQ ID No. 1 der DE-OS 196 20 649.9 dargestellt. Eine weitere Phospholipase codierende Sequenz wurde aus *Aspergillus niger* isoliert, sie unterscheidet sich in nur 6% der Aminosäuren von der homologen Sequenz aus *Aspergillus foetidus*. Sowohl die Phospholipase aus *Aspergillus niger* wie die Lysophospholipase aus *Aspergillus foetidus* bestehen aus 270 Aminosäuren und haben ein Molekulargewicht von 36000 Da (siehe SEQ ID No. 1+2). Bezüglich des Erhalts der transformierten Mikroorganismen wird auf die Offenbarung der DE-OS 196 20 649.9 Bezug genommen. Eine Phospholipase aus *Aspergillus* wurde bisher im Stand der Technik nicht beschrieben. Die Druckschrift Nakaya

et al., Eur. J. Biochem. 1990, 193 (1) 31-38 beschreibt ein Protein, dessen Sequenz der Phospholipase A2 ähnlich ist.

Durch proteinchemische Methoden ließ sich Phospholipase von Lysophospholipase trennen und hochgereinigt gewinnen. Beim Vergleich der gereinigten Phospholipase und Lysophospholipase ergaben sich folgende Unterschiede:

- Die Molekulargewichte von Phospholipase und Lysophospholipase aus *Aspergillus foetidus*, gemessen mit der SDS-Gelelektrophorese, betragen unter reduzierenden Bedingungen ca. 30000 Da für Phospholipase und ca. 36000 Da für Lysophospholipase, unter nicht reduzierenden Bedingungen dagegen liegen sie für beide Enzyme gleich bei ca. 36000 Da. Unter reduzierenden Bedingungen zerfällt die Phospholipase in zwei Ketten, von denen die größere (30000 Da) im Elektrophoresegel erfaßt wird. Das Teilstück in der Größe von ca. 6000 Da kann aus methodischen Gründen im gleichen Elektrophoresegel nicht nachgewiesen werden, jedoch kann man aus diesem Befund ableiten, daß Phospholipase aus zwei Peptidketten besteht. Diese Vorstellung wird durch das Ergebnis der Proteinsequenzierung bestätigt.

- Die Proteinsequenzierung der Phospholipase aus *Aspergillus foetidus* ergab eine hohe Übereinstimmung mit der Sequenz der Lysophospholipase, jedoch auch Unterschiede. Bei Phospholipase wurden zwei NH₂-Termini im Verhältnis 1:1 gefunden, bei Lysophospholipase dagegen nur einer. Einer der beiden NH₂-Termini der Phospholipase gehört zu einem 6000 Da-Peptid, während der andere der NH₂-Terminus des 30000 Da-Proteins ist. Während das kleinere Peptid mit den Aminosäuren 1 bis 44 des reifen Lysophospholipase-Proteins (vgl. Sequenz ID No. 1 in DE-OS 196 20 649.9) übereinstimmt, entspricht die Sequenz des 30000 Da-Proteins den Aminosäuren 45 bis 270

- 5 -

der Lysophospholipase (vgl. Sequenz ID No. 1 in DE-OS 196 20 649.9).

Dieser Befund legt nahe, daß die Phospholipase aus *Aspergillus foetidus* durch Prozessierung des Lysophospholipase-Proteins entstehen kann, wobei noch ungeklärt ist, ob die Prozessierung innerhalb oder außerhalb der Zelle stattfindet und in welcher Weise sie abläuft. Die Beziehungen zwischen Phospholipase und Lysophospholipase sind in Figur 1 dargestellt.

Weiter unterscheiden sich Phospholipase und Lysophospholipase in ihren isoelektrischen Punkten, ihren pH- und Temperaturoptima sowie sehr deutlich in ihren Temperaturstabilitäten. In der folgenden Tabelle werden diese Werte gegenübergestellt.

Tabelle 1: Vergleich der Eigenschaften von Phospholipase und Lysophospholipase aus *Aspergillus foetidus*

	Phospho- lipase	Lysophos- pholipase
Molgewicht (SDS-Gel, reduz.)	30000 Da	36000 Da
Molgewicht (SDS-Gel, nicht-reduz.)	36000 Da	36000 Da
Isoelektr. Punkt	pH 4,3	pH 4,2
Temperatur-Optimum	50°C	55°C
pH-Optimum	pH 3-4	pH 4,5
pH-Stabilität (1 Std. bei 60°C)	pH 3,5	pH 4,5
	>75% Restakt.	10% Restakt.

Zum Erhalt der Phospholipase an Stelle der Lysophospholipase aus den betreffenden Mikroorganismen sind die Fermentationsbedingungen wesentlich. Wesentlich für die Bildung der Phospholipase ist die Durchführung der Kultur in einem sauren bis leicht alkalischen Medium. Der pH-Wert liegt dabei geeigne-

- 6 -

terweise in einem Bereich von 2 bis 9, bevorzugt 3 bis 8. Unter diesen Bedingungen wird bevorzugt Phospholipase gebildet. Dabei wird wie folgt vorgegangen:

Zunächst wird ein geeigneter Wirt ausgewählt mit dem Ziel einer möglichst einfachen Herstellung der Phospholipase. Obwohl viele Arten von Schimmelpilzen als mögliche Wirte in Betracht kommen, wie zum Beispiel Vertreter der thermophilen Gattungen *Humicola*, *Thermomyces* und *Mucor*, der Gattungen *Rhizopus*, *Absidia*, *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Thielavia*, *Penicillium* und *Cephalosporium*, wurden bevorzugt Arten der Gattung *Aspergillus* verwendet. Nach Transformation mit den erfindungsgemäßen Plasmiden lassen sich Transformanten isolieren, die, verglichen mit den Wirten, Phospholipase in großen Mengen produzieren. Bevorzugt ist der transformierte Wirtsorganismus ein *Aspergillus*-Stamm der Arten *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus ellipticus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus carbonarius* oder *Aspergillus phoenicis* oder ein *Trichoderma*-Stamm der Arten *Trichoderma viride*, *Trichoderma longibrachiatum* oder *Trichoderma reesei*.

Eine Transformante, die durch Cotransformation eines Wirtsstammes mit einem Selektionsplasmid, bevorzugt mit pAN7-1, p3SR2 oder pSTA10, und einem Expressionsplasmid, bevorzugt mit pKC3, pKC9, pKC12 oder pKCN2, hergestellt wird, züchtet man in einer für den Wirtsstamm üblichen Nährlösung, die mindestens eine verwertbare C-Quelle, wie z.B. Maisschrot, Stärke, Dextrin aus Stärke, und mindestens eine verwertbare organische N-Quelle, wie z.B. Maisquellwasser, Hefeautolysat, Sojamehl, Sojaprotein oder -pepton allein oder in Kombination mit anorganischen N-Quellen wie Ammoniumsalzen oder Nitraten, enthält und nach der Sterilisation auf einen sauren bis leicht alkalischen pH-Wert eingestellt wird. Die Nährlösung kann durch Zugabe von Substanzen, die in besonderem Maße die

Bildung der Phospholipase erhöhen, ergänzt werden. Phospholipide aus Soja enthalten solche Substanzen, doch kommen sie auch in anderen Stoffklassen, wie z.B. den Polyoxyethylenethern vor. Nach Beimpfen der sterilisierten Nährlösung mit Konidien oder vegetativem Mycel der Transformante wächst diese unter Belüftung bei Temperaturen zwischen 20° und 60°C, vorzugsweise zwischen 25° und 45°C, und produziert die erfindungsgemäße Phospholipase. Während der Kultivierung wird der pH-Wert der Kultur durch Säure- oder Laugezugabe korrigiert, so daß er im sauren bis schwach alkalischen Bereich, vorzugsweise zwischen pH 3 und 8, gehalten wird. Nach 48 bis 120 Stunden Kulturdauer kann man die Phospholipase gewinnen, indem man die unlöslichen Nährlösungsreste und die Biomasse abtrennt, was üblicherweise durch Filtration geschieht, und das Filtrat mit üblichen Methoden, wie z.B. durch Ultrafiltration, konzentriert. Das Konzentrat (Retentat) kann zur Entschleimung von Pflanzenölen oder zur Behandlung von Phospholipiden eingesetzt werden. Ferner kann die Phospholipase auch zur Verbesserung der rheologischen Eigenschaften von Lebensmitteln verwendet werden.

Die folgenden Mikroorganismen wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Mascheroder Weg 1B, 38124 Braunschweig, Deutschland, gemäß den Bestimmungen des Budapester Vertrages hinterlegt:

- A. *oryzae* RH 3745: Hinterlegungsnummer DSM 11283
(Hinterlegungsdatum: 11.11.1996)
- A. *ellipticus* RH 3886: Hinterlegungsnummer DSM 11284
(Hinterlegungsdatum: 11.11.1996)
- A. *foetidus* RH 3046: Hinterlegungsnummer DSM 10652
(Hinterlegungsdatum: 24.04.1996)
- E. *coli* DH5α pKC3: Hinterlegungsnummer DSM 10653
(Hinterlegungsdatum: 24.04.1996)

E. coli DH5 α pKC9: Hinterlegungsnummer DSM 10654

(Hinterlegungsdatum: 24.04.1996)

E. coli DH5 α pKC12: Hinterlegungsnummer DSM 10655

(Hinterlegungsdatum: 24.04.1996)

E. coli pKCN2: Hinterlegungsnummer: DSM 11352

(Hinterlegungsdatum: 23.12.1996)

A. niger RH 3909: Hinterlegungsnummer DSM 11353

(Hinterlegungsdatum: 23.12.1996)

Die Erfindung wird anhand der nachstehenden Beispiele und Figuren näher erläutert.

Die Figur 1 zeigt die Prozessierung des Lysophospholipasegens aus *Aspergillus* und den Erhalt der Phospholipase.

Die Figur 2 zeigt die Konstruktion des Plasmids pKCN2.

B e i s p i e l e

Beispiel 1

Konstruktion des Expressionsvektors pKCN2

Isolierung des Lysophospholipase-Gens aus *A. niger* NRRL3

Die chromosomale DNA von *A. niger* NRRL3 wurde nach einer Vorschrift von Hynes, M.J. et al. (1983), Mol. Cell. Biol. 3, 1430-1439, isoliert.

Die erhaltene hochmolekulare DNA wurde mit *Sau3AI* partiell hydrolysiert und durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation nach ihrer Größe fraktioniert. DNA-Moleküle der Größe von 9 bis 20 kb wurden in *Bam*HI/*Eco*RI-hydrolysierte EMBL3-DNA inseriert und in-vitro verpackt.

- 9 -

Zur Identifizierung des chromosomalen Lysophospholipase-Gens in einer Lambda EMBL3-Genbank wurde das *HindIII/SalI*-cDNA Fragment aus dem Plasmid pKC1/36 als Hybridisierungssonde verwendet. Das Plasmid pKC1/36 enthielt die aus *A. foetidus* RH 3046 isolierte Lysophospholipase-cDNA.

Nach der Hybridisierung und mehrfacher Vereinzelnung ließen sich zwei positive Klone identifizieren. Die Phagen-DNA von Klon Nr. 1 wurde präpariert und mit *BamHI* hydrolysiert. Sie wies nach der Southern-Hybridisierung ein positives Signal bei ca. 9 kb auf. Das *BamHI*-Fragment wurde in pUC18 kloniert, und das resultierende Plasmid, welches das vollständige chromosomale Lysophospholipase-Gen enthielt, wurde als pKCN bezeichnet.

Konstruktion des Expressionsvektors pKCN2

In das Plasmid pKCN2 wurde das Lysophospholipase-Gen unter Kontrolle des *A. oryzae* alpha-Amylase-Promotors und des *A. nidulans* *trpC*-Terminators gesetzt.

Die Isolierung des Lysophospholipase-Gens aus dem Plasmid pKCN erfolgte mit Hilfe der PCR-Methode. Es wurden zwei Oligonukleotid-Primer mit den folgenden Sequenzen verwendet:

KC29:

5'-GGA ATT CAC CTG CTA ACC ATG TTC TCT GGA CGG TTT GGA GTG-3'

BspMI Met

(SEQ ID No. 3)

KC43:

5'-CG GGATCC AAG CTA TAG CAG ACA CTC TGA AAT TG-3'

BamHI AMB

(SEQ ID No. 4)

- 10 -

Für die Polymerase-Ketten-Reaktion wurden in einem Reaktionsvolumen von 0,1 ml 20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP (je 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) je 50 pmol KC29 und KC43, 1 ng pKCN als Matrize und 2,5 U Tag-Polymerase vermischt. Der Ansatz wurde für 20 Zyklen (94°C, 40 sek; 40°C, 1 min; 72°C, 1 min) durchgeführt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das amplifizierte Fragment gereinigt, mit BspMI und BamHI hydrolysiert und in das mit NcoI/BamHI gespaltene Plasmid pKE2 insertiert. Das Plasmid pKE2 enthält den *A. oryzae* alpha-Amylase-Promotor und den *A. nidulas* trpC-Terminator.

Die Konstruktion des Plasmids pKCN2 wurde durch eine Restriktionsanalyse und die anschließende Sequenzierung bestätigt.

Beispiel 2

Transformationsmethode für Aspergillus- und Trichoderma reesei-Stämme

Von einer ca. zwei Wochen alten Petrischalenkultur des zu transformierenden Pilzstammes wurde eine Sporensuspension in ca. 10 ml 0,85 % NaCl durch Abschwemmen unter Zuhilfenahme eines Spatels hergestellt. Es wurden je vier 1 l-Schüttelkolben mit 100 ml Czapek-Dox-Minimalmedium (Oxoid) mit 0,1 % Hefeextrakt mit je 1 ml Sporensuspension beimpft und ca. 16 Stunden bei 28°C auf einem Rundschüttler bei 120 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Das Mycel aus je vier Schüttelkolben wurde über einem Papierfilter geerntet und mit ca. 50 ml MP-Puffer (1,2 M MgSO₄ in 10 mM Phosphatpuffer, pH 5,8) gespült. Nach dem Abfließen des Puffers wurde das feuchte Mycel gewogen. In der Regel wurden ca. 3 bis 5 g Feuchtmycel erhalten.

Pro g Feuchtmycel wurden 5 ml MP-Puffer, 120 µl Novozym-Lösung (1g Novozym[®] 234 (Novo Nordisk) in 6 ml MP-Puffer) und

- 11 -

25 µl β -Glucuronidase (Sigma) zugegeben. Die Mycel-Suspension wurde 5 min in Eiswasser gestellt. Anschließend wurden 60 µl Rinderserumalbumin-Lösung (0,2 g Rinderserumalbumin in 4 ml MP-Puffer, sterilfiltriert) zugegeben, und der Ansatz wurde unter leichtem Schütteln bei 30°C inkubiert. Die Bildung von Protoplasten wurde visuell im Mikroskop verfolgt. Wenn keine wesentliche Zunahme der Protoplastenbildung mehr festzustellen war, wurde der Ansatz zur Ernte der Protoplasten abgebrochen. Dies war in der Regel nach etwa 3 bis 5 Stunden der Fall.

Die Protoplastensuspension wurde zur Abtrennung noch vorhandener grober Mycelbestandteile über ein mit MP-Puffer getränktes Glaswollefilter gegeben und in Zentrifugenröhrchen überführt. Die obere Hälfte der Röhrchen wurde mit 600 mM Sorbit, 100 mM Tris/HCl, pH 7,0 überschichtet. Die Röhrchen wurden 10 min bei 2500 g zentrifugiert. Die Protoplasten wurden aus der Zwischenschicht abgenommen und in 1 M Sorbit, 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 aufgenommen. Anschließend wurden die Protoplasten zweimal mit STC-Puffer (1 M Sorbit, 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10 mM CaCl_2) durch Zentrifugation bei 1500 g gewaschen und zuletzt in 1 ml STC-Puffer aufgenommen.

Zur Transformation von *A. oryzae* wurden 300 µl Protoplastensuspension ca. 10 µg p3SR2 als Selektionsplasmid und 10 µg des jeweiligen Plasmids zur Expression der LPL in 25 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,0 zusammengegeben und 10 min bei 0°C inkubiert. Anschließend wurden nochmals 25 µl des gleichen Plasmidgemisches und 400 µl PEG-Lösung (60% Polyethylenglykol 6000 (Fluka) in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 50 mM CaCl_2) zusammengegeben, sehr vorsichtig vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden nochmals 600 µl PEG-Lösung zugegeben, vermischt und der Ansatz für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde mit ca. 9 ml Acetamid-Weichagar (Minimalmedium mit 10 mM Acetamid als einziger N-Quelle,

- 12 -

1 M Saccharose, 0,6 Gew.-% Agar) bei 45°C gemischt und auf vier Petrischalen mit dem gleichen Medium, jedoch mit 1,5 Gew.-% Agar (Oxoid) und zusätzlich 15 mM CsCl, verteilt. Die Platten wurden bei 28°C inkubiert. Nach 6 bis 10 Tagen wurden schnell wachsende Kolonien (Transformanten) auf Acetamid-Medium ohne Saccharose überimpft, zweimal über Einzelsporkolonien gereinigt und zuletzt auf Vollmedium, z.B. Kartoffel-Dextrose-Agar, übertragen.

Die Transformation von Stämmen der Arten *A. niger*, *A. awamori*, *A. japonicus* oder *A. foetidus* kann ebenfalls mit dem Plasmid p3SR2 erfolgen. Bevorzugt wurde die Transformation jedoch mit dem Plasmid pAN7-1 ausgeführt. Die Protoplastenpräparation und die Zugabe von Plasmid-DNA erfolgt dabei in analoger Weise, wie oben für das Plasmid p3SR2 beschrieben. Statt der Zugabe von Acetamid-Weichagar wird jedoch der gesamte Transformationsansatz zu 100 ml Czapek-Dox-Minimalmedium (Oxoid) mit 100 µg Hygromycin B/ml, 1,5 Gew.-% Agar (Oxoid) und 1 M Saccharose, abgekühlt auf ca. 45°C gegeben und vorsichtig vermengt. Der Ansatz wird dann in Portionen zu je 10 ml in Petrischalen gegeben, in denen jeweils 10 ml Czapek-Dox-Minimalmedium (Oxoid) mit 1,5 Gew.-% Agar (Oxoid), jedoch ohne Hygromycin und ohne Saccharose als feste Unterschicht vorgelegt war. Nach dem Erstarren der oberen Agarschicht werden die Petrischalen bei 30 bis 37°C inkubiert. Gegen Hygromycin B resistente Transformanten können nach ca. 3 bis 10 Tagen abgeimpft werden und zur Überprüfung der Resistenz auf Czapek-Dox-Minimalmedium (Oxoid) mit 50 µg Hygromycin B/ml und 1,5 Gew.-% Agar (Oxoid) übertragen werden.

Für die Transformation von *A. sojae* oder *A. phoenicis* wird ein drittes Selektionsprinzip genutzt, da die verwendeten Stämme dieser Art sowohl Acetamid verwerten wie auch gegen Hygromycin B resistent sind. Durch Selektion auf chlorathaltigem Nährboden werden Mutanten isoliert, deren Nitratreduk-

tase-Gen (*niaD*) defekt ist, die also nicht mehr mit Nitrat als alleiniger Stickstoffquelle wachsen (Cove, D.J. (1976) *Heredity* 36, 191-203). Durch Transformation mit dem Plasmid pSTA10 (Unkles, S.E. et al. (1989) *Mol.Gen.Genet.* 218, 99-104), auf dem sich die intakte Information für das Nitratreduktase-Gen befindet, wird der Defekt ausgeglichen, so daß die Transformanten mit Nitrat als alleiniger Stickstoffquelle wachsen, während die nicht transformierten Zellen im Wachstum zurückbleiben.

Diese Methodik zur Selektion ist außer für *A. sojae* genauso für andere *Aspergillus*-Arten geeignet; die Herstellung der *niaD*-Mutanten bedeutet allerdings einen zusätzlichen Arbeitsaufwand gegenüber der Verwendung der Hygromycin B-Resistenz oder der Acetamidverwertung.

Beispiel 3

Herstellung von PL sezernierenden Transformanten

Transformanten von *A. niger*, *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. carbonarius* und *A. ellipticus*

Protoplasten dieser *Aspergillus*-Arten wurden mit der in Beispiel 1 beschriebenen Methodik hergestellt und unter Verwendung des Plasmids pAN7-1 und jeweils einem der Plasmide pKC3, pKC9, pKC12 oder pKCN2 cotransformiert. Zur Regeneration der Protoplasten wird der Transformationsansatz wie oben beschrieben auf Hygromycin plattiert, die Transformanten werden von den Regenerationsplatten isoliert, gereinigt und in Schüttelversuchen unter Verwendung der folgenden Nährlösung

- 14 -

Maltodextrin	3,75	%
Maisquellpulver	3,0	%
KH ₂ PO ₄	1,0	%
K ₂ HPO ₄	0,7	%
Triton X-100	0,10	%

in Leitungswasser, 30 min bei 121°C sterilisiert,

auf Produktion von PL geprüft. Dazu wird die Biomasse der Schüttelkulturen abfiltriert und die Phospholipase-Aktivität (PLU) im Kulturfiltrat gemessen. Transformanten zeichnen sich durch gegenüber dem Wirtsstamm deutlich erhöhte Phospholipase-Aktivität aus.

Transformanten von *A. oryzae* und *A. aculeatus*

Die Protoplastierung und Transformation wird auch mit diesen Arten wie im Beispiel 2 beschrieben durchgeführt. Die Protoplasten werden unter Verwendung des Plasmids p3SR2 und jeweils einem der Plasmide pKC3, pKC9, pKC12 oder pKCN2 cotransformiert. Zur Regeneration der Protoplasten wird der Transformationsansatz wie oben beschrieben auf Nährboden mit Acetamid als alleiniger Stickstoffquelle plattiert, die Transformanten werden von den Regenerationsplatten isoliert, gereinigt und in Schüttelversuchen unter Verwendung der folgenden Nährlösung

Maltodextrin	3,75	%
Maisquellpulver	3,0	%
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,5	%
Triton X-100	0,10	%

in Leitungswasser, 30 min bei 121°C sterilisiert,

auf Produktion von PL geprüft.

Transformanten von *A. sojae* und *A. phoenicis*

Die Stämme *A. sojae* RH 3782 *niaD*22 und *A. phoenicis* RH 3828 *niaD*, beides nach Cove (1976) hergestellte Mutanten von *A. sojae* RH 3782 und *A. phoenicis* RH 3828, werden in der nachfolgenden Nährlösung aus

Glucose (MERCK)	2	%
Malzextrakt (OXOID)	0,5	%
Bacto-Pepton (DIFCO)	0,025	%
deionisiertes Wasser		

pH-Wert auf 5,0 einstellen; Sterilisation: 30 min bei 121°C

angezogen. Aus dem Mycel werden nach der in Beispiel 1 beschriebenen Methodik Protoplasten gewonnen und diese mit pSTA10 als Selektionsplasmid und jeweils einem der Plasmide pKC3, pKC9 oder pKC12 cotransformiert. Zur Regeneration der Protoplasten wird der Transformationsansatz mit 9 ml Weichagar (osmotisch stabilisierend) bestehend aus

0,1 M Na-Phosphat-Puffer pH 6,0	15	ml
1 M Saccharose (MERCK)	10,28	g
Millipore-Wasser auf	29,1	ml
Agar (OXOID)	0,18	g (= 0,6 %)

30 min Sterilisation bei 121°C, anschließend sterile Zugabe von:

Salzlösung (7.14.2)	0,6	ml
1 M NaNO ₃ -Lösung	0,3	ml

gemischt und auf vier Agarplatten der gleichen Zusammensetzung, jedoch mit 1 % Agar hergestellt, verteilt. Nach etwa 6 bis 10 Tagen Inkubation bei 37°C werden die Transformanten von den Agarplatten isoliert, auf Nitrat-Saccharose-Agar

- 16 -

durch Ausstrich gereinigt. Es wurde eine Vielzahl Transformanten durch Selektion und anschließender Reinigung auf einem Nährboden mit Nitrat als einziger N-Quelle erhalten und in Schüttelkolben unter Verwendung der folgenden Nährlösung

Maltodextrin	3,75	%
Maisquellpulver	3,0	%
KH ₂ PO ₄	1,0	%
K ₂ HPO ₄	0,7	%
Triton X-100	1,0	%
in Leitungswasser, 30 min bei 121°C sterilisiert,		

auf Produktion von PL geprüft.

Neben Transformanten, die keine oder nur geringe Mengen von PL produzieren, sowie die nicht transformierten Wirtsstämme, werden auch solche Transformanten gefunden, die deutlich erhöhte PL-Aktivität im Kulturfiltrat aufweisen. Diese als Cotransformanten bezeichneten Stämme eignen sich zur Herstellung des Enzyms. In der Tabelle 2 sind typische Ergebnisse der PL-Bildung durch Transformanten und durch die nicht transformierten Wirte gegenübergestellt.

Tabelle 2: Vergleich der PL-Bildung von Wirtsstämmen und Transformanten.

Stamm bzw. Transformante	relative PL-Aktivität
<i>A. oryzae</i> RH 3745	100
<i>A. oryzae</i> RH 3745 p3SR2 pKC9	3000-4000
<i>A. oryzae</i> RH 3745 p3SR2 pKCN2	2000-2500
<i>A. sojae</i> RH 3782 <i>niaD</i> 22	100
<i>A. sojae</i> RH 3782 <i>niaD</i> 22 pSTA10 pKC9	500-700
<i>A. foetidus</i> RH 3046	100
<i>A. foetidus</i> RH 3046 pAN7-1 pKC9	1000-1500
<i>A. phoenicis</i> RH 3828 <i>niaD</i>	100
<i>A. phoenicis</i> RH 3828 <i>niaD</i> pSTA10 pKC9	400-600
<i>A. ellipticus</i>	100
<i>A. ellipticus</i> pAN7-1 pKC12	800-900
<i>A. heteromorphus</i> <i>niaD</i>	100
<i>A. heteromorphus</i> <i>niaD</i> pSTA10 pKC9	900-1000
<i>A. carbonarius</i>	100
<i>A. carbonarius</i> pAN7-1 pKC9	400-600
<i>A. aculeatus</i>	100
<i>A. aculeatus</i> p3SR2 pKC9	900-1200
<i>A. niger</i>	100
<i>A. niger</i> pAN7-1 pKC12	700-1000
<i>A. awamori</i>	100
<i>A. awamori</i> pAN7-1 pKC12	600-800

Beispiel 4Reinigung der PL aus *A. foetidus*

2080 ml Kulturretentat von *A. foetidus* RH 3788 wurden, um die elektrische Leitfähigkeit herabzusetzen, mit 3520 ml destilliertem Wasser verdünnt und mit 160 ml 1 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt. Die Probe hatte ein Volumen von 5760 ml und eine Leitfähigkeit von 7,8 mS/cm.

In einem weiteren Schritt wurde eine Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Fractogel (MERCK) vorgenommen. Dazu wurden 5760 ml der Enzymlösung in vier Ansätzen (à 1440 ml) auf eine DEAE-Fractogel-Säule (Höhe 278 mm, Durchmesser 100 mm) aufgetragen. Die Säule wurde mit Puffer A (20 mM Phosphatpuffer aus $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7,0 + 15 mM NaCl) gespült. Die Elution erfolgte in einem kontinuierlichen Gradienten von Puffer A zu Puffer B (Puffer A + 1 M NaCl). Es wurde bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 70 ml/min eluiert und Fraktionen zu je 350 ml aufgefangen.

Die Fraktionen wurden auf Anwesenheit der PL getestet. Dies geschah durch Messung der PL-Aktivität. Eine PL-Einheit ist danach definiert als die Enzymmenge, die in einer wässrigen Lösung von Lecithin bei pH 3,5 und 40°C eine Hydrolysegeschwindigkeit von 1 $\mu\text{M}/\text{min}$ bewirkt.

Die Messung der PL-Aktivität wurde wie folgt ausgeführt:

Substrat: 1 g Epikuron 200 (Phosphatidylcholin von Fa. Lucas Meyer) + 100 g destilliertes Wasser + 5 ml 0,32 M CaCl_2 -Lösung wurden mit dem Ultra Turrax homogenisiert.

Analyse: 10 ml Substrat wurden mit 10 ml 1 %iger Triton X-100 Lösung (Fa. Fluka) und 5 ml 0,0033 M Zitronensäure-Monohydratlösung versetzt und 10 min bei 40°C temperiert; der pH stellt sich auf 3,4 bis 3,5 ein. 0,1 ml Enzymlösung wurden zugegeben, und das Gemisch wurde 10 min bei 40°C inkubiert. Die Enzymkonzentration im Analysenansatz sollte nicht über 2,5 U/g liegen. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde mit 0,01 M KOH auf pH 10,0 zurücktitriert, wobei die ersten 5 ml zügig zugegeben wurden und dann die Titriergeschwindigkeit verringert wurde, um ein Übertitrieren zu vermeiden.

Für den Blindwert (BW) wurde das Enzym 15 min auf ca. 95°C erhitzt und inaktiviert. Nach dem Abkühlen verdünnte man es wie für den Hauptwert (HW) und verfuhr weiter wie mit dem Hauptwert.

Berechnung:

$$= \text{PLU/g, pH 3,5} = \frac{\text{HW (ml)} - \text{BW (ml)} * 0,01 \text{ M} * 1000}{10 \text{ min} * 0,1 \text{ ml} * \text{Enzymkonz. g/ml}}$$

In der Patentanmeldung 195 27 274.9 vom 26.07.1995 wird die Phospholipase in Lecithase-Units, LU/g angegeben. 1 Lecithase-Unit ist dabei jene Enzymmenge, die bei 40°C, pH 8 aus Eigelb in einer Minute 1 µM Fettsäure freisetzt. 1 LU/g, pH 8 entsprechen 108 PLU/g, pH 3,5.

Die Elution der PL setzte bei ca. 0,11 M NaCl ein. Die PL-haltigen Fraktionen aus vier Läufen wurden vereinigt (8950 ml) und über einen CH2A-Konzentrator der Fa. Amicon, Hollow-Fiber Patrone MG10.000 auf ein Volumen von 2570 ml eingengt. Diese Probe wurde mit 782 ml 3 M Ammoniumsulfatlösung unter Rühren versetzt (Probe enthält jetzt 0,7 M Ammoniumsulfat).

Im nächsten Schritt wurden 3352 ml der Probe auf eine Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow, Low Substitution-Säule (Pharmacia, Höhe 215 mm, Durchmesser 100 mm) aufgetragen. Die Säule wurde mit Puffer C (20 mM Phosphatpuffer, pH 7,0 + 0,5 M Ammoniumsulfat) nachgewaschen und mit einem kontinuierlichen fallenden Gradienten von Puffer C nach Puffer D (20 mM Phosphatpuffer, pH 7,0) eluiert. Die PL-haltigen Fraktionen wurden vereint (790 ml) und mit dem Konzentrator (siehe oben) eingengt und gegen Puffer D dialysiert; es wurden 150 ml Probe erhalten.

In einem weiteren Schritt wurden je 30 ml der Probe in 5 Ansätzen auf eine Mono Q- (Pharmacia, 6,3 ml)-Anionenaustausch-Chromatographie-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit Puffer D gespült, und die Elution erfolgte in einem kontinuierlichen Gradienten von Puffer D zu Puffer B und setzte dabei für die PL bei ca. 200 mM NaCl ein.

Die PL-haltigen Fraktionen wurden vereint und über PD-10-Säulen (Pharmacia) gegen Puffer E (20 mM Phosphatpuffer, pH 7,1) dialysiert. Die Probe hatte ein Volumen von 24 ml.

Endreinigung der PL über Mono P HR5/20 (Chromatofokussierung)

Die 24 ml (siehe oben) wurden auf die MONO P-Säule (Höhe 200 mm, Durchmesser 5 mm) aufgetragen. Die Säule wurde mit Puffer E nachgewaschen. Die Probe wurde mit Puffer F (Polybuffer 74 von Pharmacia 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und auf pH 4,0 mit 1 M HCl eingestellt) eluiert. Die PL eluierte, nachdem das 13fache Säulenvolumen an Puffer F die Säule passiert hatte.

Das gereinigte Protein zeigt in der SDS-Gelelektrophorese eine einheitliche Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 31000 Dalton. Der isoelektrische Punkt liegt bei ca. pH 4,3. Das auf diese Weise gereinigte Protein wurde zur Sequenzie-

runge verwendet. Die so isolierte Phospholipase wurde zur Gewinnung von Antikörpern in Kaninchen verwendet. Die Immunisierung wurde mit dem bei Harlowe und Lane (Lit: Ed Harlowe und David Lane, Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) beschriebenen Standardverfahren durchgeführt. Das erhaltene Antiserum konnte direkt für Western blots (wie ebenfalls bei Harlowe und Lane beschrieben) eingesetzt werden, wo es spezifisch die Phospholipasebande markierte.

Beispiel 5

Entschleimung von Sojaöl

200 g naßentschleimtes Sojaöl mit einem Rest-Phosphatgehalt von 160 ppm wird in einem Rundkolben auf 40°C erwärmt. Dazu gibt man 10 g Wasser, in dem 20 mg Zitronensäure und 100 Units Phospholipase enthalten sind. Das Enzym stammt aus der Fermentation einer *Aspergillus niger*-Transformante, die das Phospholipase-Konstrukt enthält. Die Aktivitätsbestimmung erfolgt bei pH 3,5. Dazu werden 10 ml 1 %iges Phosphatidylcholin (Epikuron 200 von Lucas Meyer), das 0,5 ml 0,32 M CaCl_2 enthält, mit 10 ml Triton X-100 Lösung und 5 ml 0,0033 M Zitronensäure-Monohydrat versetzt und 10 Minuten bei 40°C temperiert. 0,1 ml entsprechend verdünnter Enzymlösung werden zugegeben und 10 Minuten bei 40°C inkubiert. Mit 0,01 M KOH-Lösung wird auf pH 10 titriert. Der Blindwert (bei 95°C für 15 Minuten erhitzte Enzymlösung im Ansatz) wird abgezogen und die Berechnung gemäß Beispiel 3 vorgenommen.

Der Inhalt des Rundkolbens wird mittels einer externen Kreiselpumpe intensiv dispergiert. Dabei wird der Inhalt des Kolbens etwa einmal pro Minute durchgesetzt. Die Wasserphase liegt dabei in einer Teilchengröße von unter 1 μ . In Zeitabständen von zwei Stunden werden Proben genommen und auf Phosphorgehalt untersucht. Dabei ergaben sich folgende Werte:

- 22 -

Zeit in Stunden	0	2	4	6	8
Phosphorgehalt in ppm	160	24	12	7	3

Versuche, bei denen wie beschrieben verfahren wurde, aber anstelle des Enzympräparats eine entsprechende Menge Molkenprotein, also nichtenzymatisches Protein oder Lysophospholipase des Handels (G-Zyme von Enzyme Biosystems, USA, 1000 Lysophospholipase Units pro 200 ml Sojaöl) zugesetzt wurden, konnte der Phosphorgehalt nicht unter 80 ppm gesenkt werden.

Beispiel 6

Verbesserung der Teigqualität

Der folgende Backversuch wurde mit der erfindungsgemäßen Phospholipase durchgeführt. Aus 100 Gew. Tln. Mehl, 2 Gew. Tln. Salz, 3 Gew. Tln. Backhefe, 58 bis 60 Gew. Tln. Wasser und 40 bis 50 ppm Ascorbinsäure (bezogen auf das Teiggewicht) wurde in einem Spiralknetter (Fabrikat Kemper) 2 min auf niedriger Stufe 1 und 6 min auf höherer Stufe 2 ein Teig bereitet. Dem Wasser wurden vor Beginn des Knetvorgangs die Enzyme und anderen Zusätze zugegeben. Die Teigtemperatur betrug 23° bis 25°C. Nach einer Teigruhe von 20 min wurde der Teig zur Herstellung von freigeschobenem Weißbrot in 350 g-Stücke geteilt, geformt, 70 min bzw. 90 min bei 32°C und 80 % relativer Luftfeuchte gegart und 32 min bei 230°C gebacken. In der Tabelle 3 ist das Brotvolumen bei verschiedenen Enzymzusätzen angegeben. Die Backergebnisse zeigen, daß durch Zusatz von Phospholipase das Backvolumen und die Krumstruktur verbessert werden. Die stabilisierende Wirkung auf den Teig zeigt sich in den guten Backergebnissen bei verlängerter Garzeit (90 min).

Tabelle 3: Backversuche

Zusätze/ 100 kg Mehl	Backvolumen 70 min Gare	%	90 min Gare	%	Poren- struktur
ohne Zusatz	1000 ccm	100	1050 ccm	100	ungleich- mäßig
Pilzamylase 10000 SKB	1050 ccm	105	1130 ccm	107	ungleich- mäßig
Pilzamylase 10000 SKB + Phospholipase 2500 PLU	1100 ccm	110	1225 ccm	117	ungleich- mäßig
Pilzamylase 50000 SKB	1225 ccm	122	1275 ccm	121	ungleich- mäßig
Pilzamylase 50000 SKB + Phospholipase 12500 PLU	1275 ccm	128	1365 ccm	130	gleich- mäßig
Pilz-Xylanase 12000 UXYL	1325 ccm	133	1375 ccm	131	gleich- mäßig
Pilz-Xylanase 1200 UXYL + Phospholipase 12500 PLU	1375 ccm	138	1475 ccm	140	gleich- mäßig

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(1) ANMELDER:

(A) NAME: ROEHM GMBH
(B) STRASSE: Kirschenallee
(C) ORT: Darmstadt
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 64293

(A) NAME: LOEFFLER, Fridolin
(B) STRASSE: Karl-Henkelmann-Weg 4
(C) ORT: Bensheim
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 64625

(A) NAME: JUNGSCHAFFER, Gerald
(B) STRASSE: Haehnleiner Strasse 1A
(C) ORT: Alsbach-Haehnlein
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 64665

(A) NAME: KHANH, Quoc Nguyen
(B) STRASSE: Am Tannenberg 9
(C) ORT: Reichelsheim
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 64385

(A) NAME: SCHUSTER, Erwin
(B) STRASSE: Darmstaedter Str. 237
(C) ORT: Bensheim-Auerbach
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 64625

(A) NAME: SPROESSLER, Bruno
(B) STRASSE: Auf der Schmelz 93
(C) ORT: Rossdorf
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 64380

(A) NAME: WOLF, Sabine
(B) STRASSE: Oetzbergstrasse 44
(C) ORT: Oetzberg
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 64853

- 25 -

- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Protein mit Phospholipaseaktivitaet
 - (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4
 - (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:
 - (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
 - (B) COMPUTER: IBM PC compatible
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 1368 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Doppelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
 - (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 - (iv) ANTISENSE: NEIN
 - (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: intron
 - (B) LAGE: 222..275
 - (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: intron
 - (B) LAGE: 442..486
 - (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: intron
 - (B) LAGE: 824..874
 - (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 - (B) LAGE: join(140..221, 276..441, 487..823, 875..1180)

- 26 -

(ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
 (B) LAGE:221..1180

(ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide
 (B) LAGE:140..220

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATGGGGAATT GGGGTGGGTA ATATGATACA GGTATAAAAG GGGGCTCGGA GGTGCAGTTG	60
GATAGAAGCA TTGTGTGTGC ATTGCAGCAG TCCGTTGGTC TCACGTCTCT GGTTCCTCG	120
ATTGTATATA TACTGCAGG ATG TTC TCT GGA CGG TTT GGA GTG CTT TTG ACA	172
Met Phe Ser Gly Arg Phe Gly Val Leu Leu Thr	
-27 -25 -20	
GCG CTT GCT GCG CTG TGT GCT GCG GCA CCG ACA CCA CTT GAT GTG CGG A	221
Ala Leu Ala Ala Leu Cys Ala Ala Ala Pro Thr Pro Leu Asp Val Arg	
-15 -10 -5	
GTAGGTGTGC CTGATTTGAA GTGGCTGGAT AGCACTGATG AAGGTTTTGA ATAG GT	277
Ser	
1	
GTC TCG ACT TCC ACG TTG GAT GAG CTG CAA TTG TTC TCG CAA TGG TCT	325
Val Ser Thr Ser Thr Leu Asp Glu Leu Gln Leu Phe Ser Gln Trp Ser	
5 10 15	
GCC GCA GCT TAT TGC TCG AAC AAT ATC GAC TCG GAC GAC TCT AAC GTG	373
Ala Ala Ala Tyr Cys Ser Asn Asn Ile Asp Ser Asp Asp Ser Asn Val	
20 25 30	
ACA TGC ACG GCC GAC GCC TGT CCA TCA GTC GAG GAG GCG AGC ACC AAG	421
Thr Cys Thr Ala Asp Ala Cys Pro Ser Val Glu Glu Ala Ser Thr Lys	
35 40 45	
ATG CTG CTG GAG TTT GAC CT GTATGTTGCT CCAGTGAAAT GGATAGAACA	471
Met Leu Leu Glu Phe Asp Leu	
50 55	
CAGCTGATTG AATAG G ACA AAT AAC TTT GGA GGC ACA GCC GGT TTC CTG	520
Thr Asn Asn Phe Gly Gly Thr Ala Gly Phe Leu	
60 65	
GCC GCG GAC AAC ACC AAC AAG CGG CTC GTG GTC GCC TTC CGA GGC AGT	568
Ala Ala Asp Asn Thr Asn Lys Arg Leu Val Val Ala Phe Arg Gly Ser	
70 75 80	
AGC ACC ATC AAG AAC TGG ATT GCT GAT CTC GAC TTC ATC CTG CAA GAT	616
Ser Thr Ile Lys Asn Trp Ile Ala Asp Leu Asp Phe Ile Leu Gln Asp	
85 90 95	

- 27 -

AAC GAT GAC CTC TGT ACT GGC TGC AAG GTT CAC ACT GGA TTC TGG AAG Asn Asp Asp Leu Cys Thr Gly Cys Lys Val His Thr Gly Phe Trp Lys 100 105 110 115	664
GCA TGG GAA GCC GCT GCA GAC AAT CTG ACG AGC AAG ATC AAG TCC GCG Ala Trp Glu Ala Ala Ala Asp Asn Leu Thr Ser Lys Ile Lys Ser Ala 120 125 130	712
ATG AGC ACG TAT TCG GGC TAT ACC CTC TAC TTC ACC GGG CAC AGC TTG Met Ser Thr Tyr Ser Gly Tyr Thr Leu Tyr Phe Thr Gly His Ser Leu 135 140 145	760
GGC GGC GCA TTG GCT ACA CTG GGA GCA ACG GTC TTG CGA AAT GAC GGT Gly Gly Ala Leu Ala Thr Leu Gly Ala Thr Val Leu Arg Asn Asp Gly 150 155 160	808
TAT AGC GTT GAA CTG GTGAGTGCTT CAGAGGGTGA TCATTAAACA GCCGGTTCTG Tyr Ser Val Glu Leu 165	863
ACAGTCAATA G TAC ACC TAT GGA TGT CCT CGA GTC GGA AAC TAT GCG CTG Tyr Thr Tyr Gly Cys Pro Arg Val Gly Asn Tyr Ala Leu 170 175 180	913
GCC GAG CAC ATC ACC AGC CAG GGA TCT GGA GCG AAC TTC CCT GTT ACA Ala Glu His Ile Thr Ser Gln Gly Ser Gly Ala Asn Phe Pro Val Thr 185 190 195	961
CAC TTG AAC GAC ATC GTC CCC CGG GTG CCA CCC ATG GAC TTT GGA TTC His Leu Asn Asp Ile Val Pro Arg Val Pro Pro Met Asp Phe Gly Phe 200 205 210	1009
AGC CAG CCA AGT CCA GAA TAC TGG ATC ACC AGT GGC ACC GGA GCC AGT Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Gly Thr Gly Ala Ser 215 220 225	1057
GTC ACG GCG TCG GAT ATT GAA CTC ATC GAG GGA ATC AAT TCG ACG GCG Val Thr Ala Ser Asp Ile Glu Leu Ile Glu Gly Ile Asn Ser Thr Ala 230 235 240 245	1105
GGG AAT GCA GGC GAA GCA ACG GTG GAC GTT TTG GCT CAC TTG TGG TAC Gly Asn Ala Gly Glu Ala Thr Val Asp Val Leu Ala His Leu Trp Tyr 250 255 260	1153
TTT TTC GCA ATT TCA GAG TGT CTG CTA TAGCTTGGAC AGTCCGATGA Phe Phe Ala Ile Ser Glu Cys Leu Leu 265 270	1200
AATAAGTGCG GAGAGAAAGT GTAAATAGTA ATTAAGTATA TATCAGGCAG AGAAGCAGTG	1260
GTGGTCAGAG AAGAAAGAGT GAGTCCCATT ACGTAGCAGA TAACCACGTG TGGAGGCGCT	1320
GTTCTCCAC TTGCAGTTGC GGCCATCAAT CATATTCTTC TCCTTACT	1368

- 28 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 297 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

```

Met Phe Ser Gly Arg Phe Gly Val Leu Leu Thr Ala Leu Ala Ala Leu
-27      -25              -20              -15

Cys Ala Ala Ala Pro Thr Pro Leu Asp Val Arg Ser Val Ser Thr Ser
-10              -5              1              5

Thr Leu Asp Glu Leu Gln Leu Phe Ser Gln Trp Ser Ala Ala Ala Tyr
              10              15              20

Cys Ser Asn Asn Ile Asp Ser Asp Asp Ser Asn Val Thr Cys Thr Ala
              25              30              35

Asp Ala Cys Pro Ser Val Glu Glu Ala Ser Thr Lys Met Leu Leu Glu
              40              45              50

Phe Asp Leu Thr Asn Asn Phe Gly Gly Thr Ala Gly Phe Leu Ala Ala
              55              60              65

Asp Asn Thr Asn Lys Arg Leu Val Val Ala Phe Arg Gly Ser Ser Thr
              70              75              80              85

Ile Lys Asn Trp Ile Ala Asp Leu Asp Phe Ile Leu Gln Asp Asn Asp
              90              95              100

Asp Leu Cys Thr Gly Cys Lys Val His Thr Gly Phe Trp Lys Ala Trp
              105              110              115

Glu Ala Ala Ala Asp Asn Leu Thr Ser Lys Ile Lys Ser Ala Met Ser
              120              125              130

Thr Tyr Ser Gly Tyr Thr Leu Tyr Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly
              135              140              145

Ala Leu Ala Thr Leu Gly Ala Thr Val Leu Arg Asn Asp Gly Tyr Ser
              150              155              160              165

Val Glu Leu Tyr Thr Tyr Gly Cys Pro Arg Val Gly Asn Tyr Ala Leu
              170              175              180

Ala Glu His Ile Thr Ser Gln Gly Ser Gly Ala Asn Phe Pro Val Thr
              185              190              195

His Leu Asn Asp Ile Val Pro Arg Val Pro Pro Met Asp Phe Gly Phe
              200              205              210

```

- 29 -

Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Gly Thr Gly Ala Ser
 215 220 225

Val Thr Ala Ser Asp Ile Glu Leu Ile Glu Gly Ile Asn Ser Thr Ala
 230 235 240 245

Gly Asn Ala Gly Glu Ala Thr Val Asp Val Leu Ala His Leu Trp Tyr
 250 255 260

Phe Phe Ala Ile Ser Glu Cys Leu Leu
 265 270

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GGAATTCACC TGCTAACCAT GTTCTCTGGA CCGTTTGGAG TG

42

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

CGGGATCCAA GCTATAGCAG ACACTCTGAA ATTG

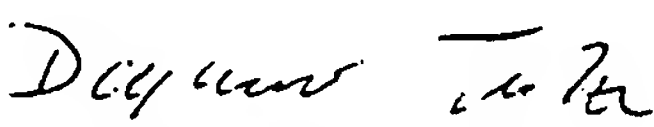
34

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN¹
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Röhm GmbH
Kirschenallee 42
64293 Darmstadt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: RH 3745	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 11283
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde <input type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1996-11-11 (Datum der Ersthinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1996-11-15

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

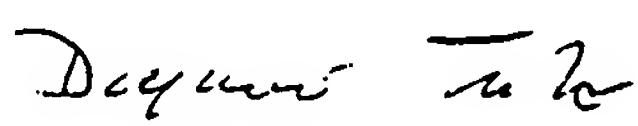
BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Röhm GmbH
Kirschenallee 42

64293 Darmstadt

LEBENSFAHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Röhm GmbH Kirschenallee 42 Anschrift: 64293 Darmstadt	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeordnete EINGANGSNUMMER: DSM 11283 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: 1996-11-11
III. LEBENSFAHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1996-11-12 ¹ geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus <input checked="" type="checkbox"/> (X) lebensfähig <input type="checkbox"/> () nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST ²	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1996-11-15

¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.

² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.

Zutreffendes ankreuzen.

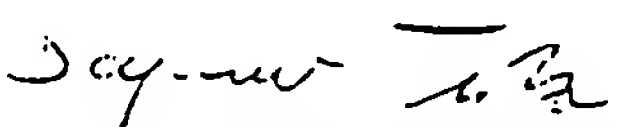
Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN¹
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Röhm GmbH
Kirschenallee 42
64293 Darmstadt

EMPFANGSBESTATIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugewiesenes Bezugszeichen: RH 3886	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugewiesene EINGANGSNUMMER: DSM 11284
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p>() eine wissenschaftliche Beschreibung (X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1996-11-11 (Datum der Ersthinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
<p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p>	<p>Unterschriften) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p> Datum: 1996-11-15</p>


¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Röhm GmbH
Kirschenallee 42
64293 Darmstadt

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Röhm GmbH Kirschenallee 42 Anschrift: 64293 Darmstadt	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 11284 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: 1996-11-11
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1996-11-12 ¹ geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus <input checked="" type="checkbox"/> (X) ¹ lebensfähig <input type="checkbox"/> () ¹ nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST ¹	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1996-11-15


Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
Zutreffendes ankreuzen.
Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Röhm GmbH
Kirschenallee
64293 Darmstadt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugehörtes Bezugszeichen: RH 3046	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugehörte EINGANGSNUMMER: DSM 10652
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p>() eine wissenschaftliche Beschreibung (X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
<p>Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1996-04-24 (Datum der Ersthinterlegung) eingegangen ist.</p>	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
<p>Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).</p>	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1996-04-26

* Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.


BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Röhm GmbH
Kirschenallee

64293 Darmstadt

LEBENSFAHIGKEITSDESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Röhm GmbH Kirschenallee Anschrift: 64293 Darmstadt	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 10652 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung ¹ : 1996-04-24
III. LEBENSFAHIGKEITSDESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1996-04-24 ¹ geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus <input checked="" type="checkbox"/> (X) ¹ lebensfähig <input type="checkbox"/> () ¹ nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFAHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST ²	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ernannten Bediensteten:  Datum: 1996-04-26


¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
Zutreffendes ankreuzen.
Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN:
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Röhm GmbH
Kirschenallee
64293 Darmstadt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: pKC3	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 10653
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde <input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht (Zutreffendes ankreuzen)	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1996-04-24 (Datum der Ersthinterlegung) eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschriften der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1996-04-26


* Falls Regel 6.1 Buchstabe c zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Röhm GmbH
Kirschenallee
64293 Darmstadt

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Röhm GmbH Kirschenallee Anschrift: 64293 Darmstadt	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 10653 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung ¹ : 1996-04-24
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1996-04-24 ¹ geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus <input checked="" type="checkbox"/> lebensfähig <input type="checkbox"/> nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST ²	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1996-04-26


- ¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
- ² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
- ³ Zutreffendes ankreuzen.
- ⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Röhm GmbH
Kirschenallee
64293 Darmstadt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugelegtes Bezugszeichen: pKC9	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 10654
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht (Zutreffendes ankreuzen)</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
<p>Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1996-04-24 (Datum der Ersthinterlegung)¹ eingegangen ist.</p>	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
<p>Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).</p>	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1996-04-26
Anschrift Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	


¹ Falls Regel 6.1 Buchstabe c zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Röhm GmbH
Kirschenallee
64293 Darmstadt

LEBENSFAHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Röhm GmbH Kirschenallee Anschrift: 64293 Darmstadt	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 10654 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: 1996-04-24
III. LEBENSFAHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1996-04-24 'geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus <input checked="" type="checkbox"/> ' lebensfähig <input type="checkbox"/> ' nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFAHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1996-04-26


- Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
- In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
- Zutreffendes ankreuzen.
- Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Röhm GmbH
Kirschenallee
64293 Darmstadt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: pKC12	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 10655
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde <input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1996-04-24 (Datum der Ersthinterlegung) eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschriften der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Personen) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1996-04-26

* Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist


BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Röhm GmbH
Kirschenallee

64293 Darmstadt

LEBENSFAHIGKEITSDESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Röhm GmbH Kirschenallee Anschrift: 64293 Darmstadt	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 10655 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung ¹ : 1996-04-24
III. LEBENSFAHIGKEITSDESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1996-04-24 ¹ geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus (X) ¹ lebensfähig () ¹ nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFAHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST ²	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1996-04-26


- ¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datum der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
³ Zutreffendes ankreuzen.
⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Röhm GmbH
Kirschenallee 42
64293 Darmstadt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: pKCN2	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 11352
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1996-12-23 (Datum der Ersthinterlegung) eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1997-01-09

* Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.


BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Röhm GmbH
Kirschenallee 42

64293 Darmstadt

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER		II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Name: Röhm GmbH Kirschenallee 42 Anschrift: 64293 Darmstadt		Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 11352 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: 1996-12-23	
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG			
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1996-12-23 geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus (X) lebensfähig () nicht mehr lebensfähig			
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST			
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE			
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1997-01-09	


Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
Zutreffendes ankreuzen.
Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Röhm GmbH
Kirschenallee 42
64293 Darmstadt

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG.
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: RH 3909	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 11353
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p>() eine wissenschaftliche Beschreibung (X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
<p>Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1996-12-23 (Datum der Ersthinterlegung) eingegangen ist.</p>	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
<p>Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).</p>	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1997-01-09

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.


BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Röhm GmbH
Kirschenallee 42

64293 Darmstadt

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER		II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Name: Röhm GmbH Kirschenallee 42 Anschrift: 64293 Darmstadt		Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 11353 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: 1996-12-23	
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG			
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1996-12-27 ¹ geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus (X) ¹ lebensfähig () ¹ nicht mehr lebensfähig			
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST ²			
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE			
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1997-01-09	

¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung. Zutreffendes ankreuzen.
³ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

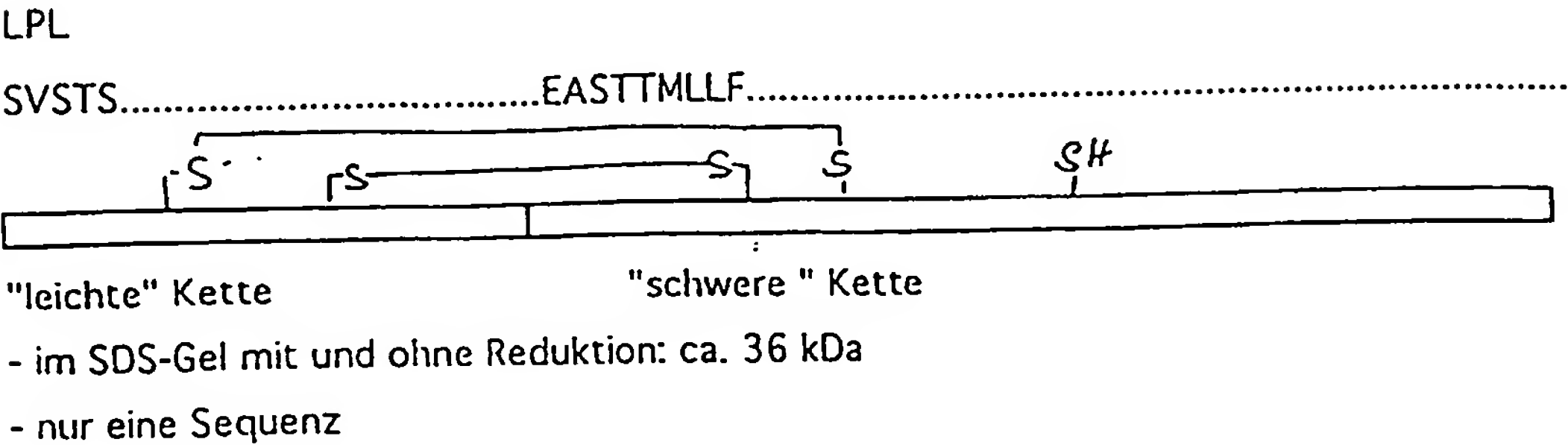
Patentansprüche

1. Protein mit Phospholipaseaktivität dadurch gekennzeichnet, daß es die reife Sequenz der *Aspergillus*-Lysophospholipase oder eine davon abgeleitete Sequenz besitzt und an mindestens einer Stelle gespalten sein kann, wobei im Falle einer Spaltung die Spaltstücke entweder über mindestens eine unter reduzierenden Bedingungen spaltbare Bindung verknüpft sind, oder von den unverknüpften Spaltstücken mindestens eines Phospholipaseaktivität besitzt.
2. Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es an mindestens einer Stelle gespalten ist und die Spaltstücke entweder über mindestens eine unter reduzierenden Bedingungen spaltbare Bindung verknüpft sind, oder von den unverknüpften Spaltstücken mindestens eines Phospholipaseaktivität besitzt.
3. Protein nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz mit Phospholipaseaktivität zu der analogen Sequenz der *Aspergillus*-Lysophospholipase zu mindestens 80% homolog ist.
4. Protein nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß es die reife Sequenz der *Aspergillus foetidus*-Lysophospholipase oder eine davon abgeleitete Sequenz besitzt und die Spaltstelle sich zwischen Position 44 und 45 der Aminosäuresequenz befindet.
5. Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es aus *Aspergillus*-Kulturen isolierbar ist.

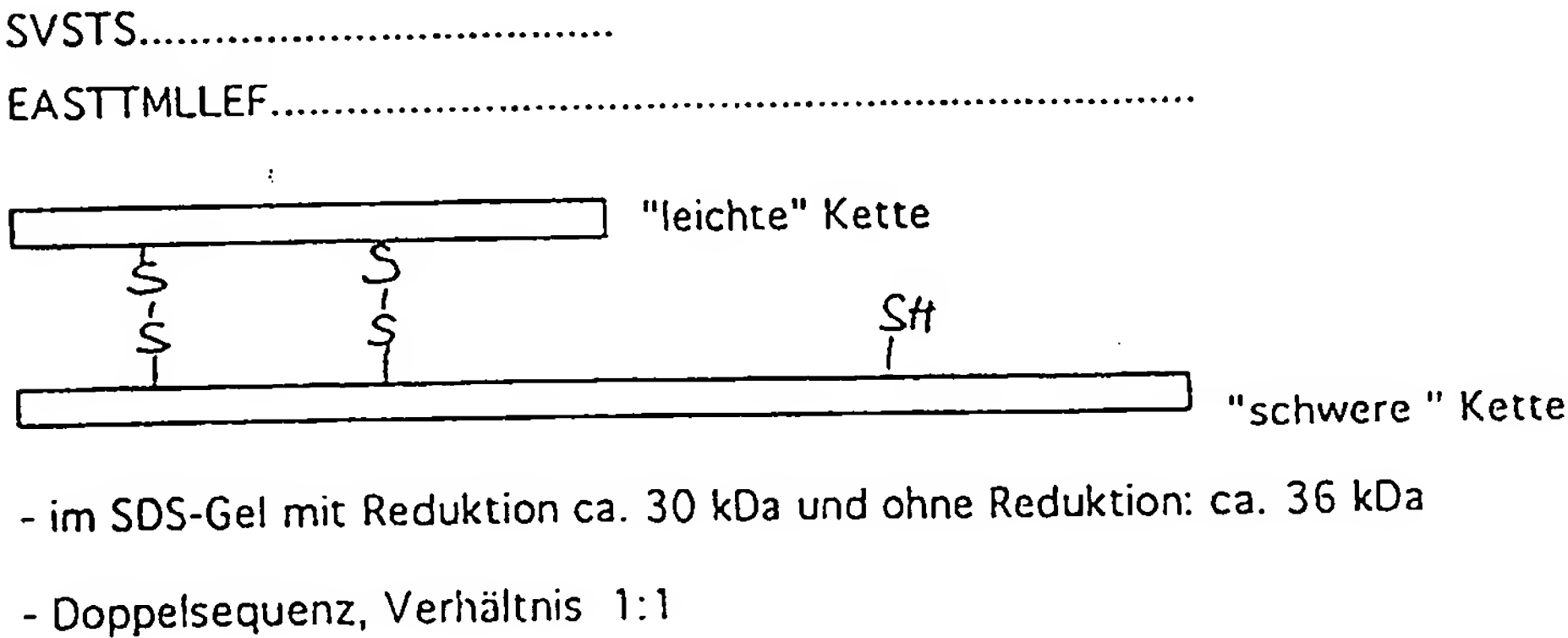
6. Protein nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es aus Kulturen von *A. foetidus*, *A. niger* oder *A. oryzae* isolierbar ist.
7. Protein mit Phospholipaseaktivität, dadurch gekennzeichnet, daß es von einem Antikörper gegen gereinigte Phospholipase aus *Aspergillus foetidus* RH 3046 erkannt wird.
8. Verfahren zur Produktion eines Proteins mit Phospholipaseaktivität nach Anspruch 1 durch Fermentation eines in geeigneter Weise transformierten Lysophospholipase produzierenden Wirtsorganismus in einem geeigneten Kulturmedium und Isolierung des Proteins mit Phospholipaseaktivität aus dem zellfreien Kulturfiltrat, dadurch gekennzeichnet, daß man die Fermentation im sauren bis leicht alkalischen Bereich durchführt.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man die Fermentation bei einem pH-Wert von 2 bis 9, bevorzugt 3 bis 8, durchführt.
10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß als transformierter Wirtsorganismus ein *Aspergillus*-Stamm oder ein *Trichoderma*-Stamm verwendet wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß als transformierter Wirtsorganismus *Aspergillus foetidus* oder *Aspergillus oryzae* verwendet wird.
12. Verwendung eines Proteins nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Entschleimung von pflanzlichem Öl.

13. Verwendung eines Proteins nach einem der Ansprüche 1 bis 7 als Backhilfsmittel.

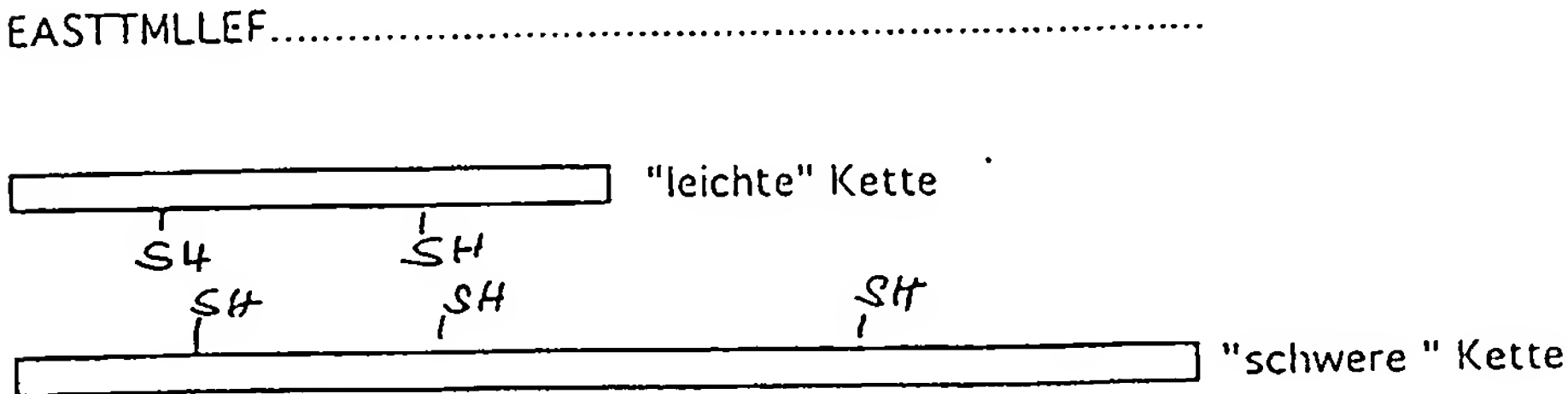
FIGUR 1: Prozessierung des Lysophospholipasegens aus Aspergillus und Erhalt der Phospholipase



PL ohne Reduktion



PL mit Reduktion



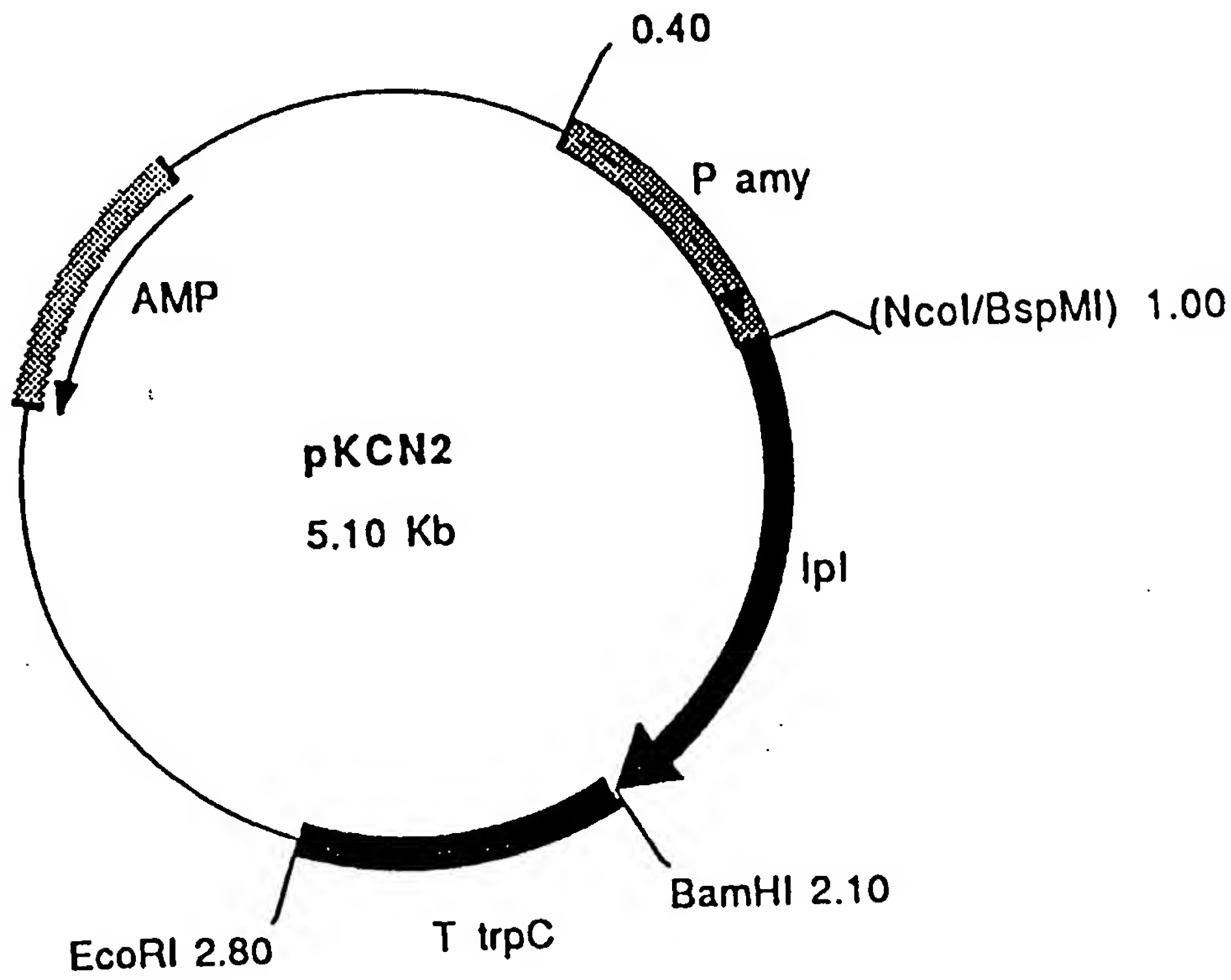
- im SDS-Gel ca. 30 kDa, leichte Kette läuft mit der Front daher nicht nachweisbar
- nur eine Sequenz

"schwere" Kette ca. 30 kDa

"leichte" Kette ca. 6 kDa

Summe ca. 36 kDa

FIGUR 2: Konstruktion des Plasmids pKCN2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 98/00081

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N9/16 C12N9/18 C12N1/15 C12P21/02 C11B3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C12P C11B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	EP 0 808 903 A (ROEHM GMBH) 26 November 1997 see the whole document ---	1-11
P, X	WO 97 05219 A (ROEHM GMBH ;METALLGESELLSCHAFT AG (DE); LOEFFLER FRIDOLIN (DE); PL) 13 February 1997 see the whole document ---	12
X	EP 0 575 133 A (SANKYO CO) 22 December 1993 see the whole document ---	1-7, 12, 13
Y		8-11
Y	WO 95 22615 A (NOVONORDISK AS ;SVENDSEN ALLAN (DK); CLAUSEN IB GROTH (DK); OKKELS) 24 August 1995 see the whole document -----	8-11

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 May 1998

Date of mailing of the international search report

25/05/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hillenbrand, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/00081

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0808903 A	26-11-1997	DE 19620649 A	27-11-1997
		AU 1997697 A	27-11-1997
		CA 2205411 A	22-11-1997
WO 9705219 A	13-02-1997	DE 19527274 A	30-01-1997
EP 0575133 A	22-12-1993	AU 667217 B	14-03-1996
		AU 4130893 A	23-12-1993
		CA 2098421 A	17-12-1993
		FI 932758 A	17-12-1993
		IL 106033 A	04-01-1998
		JP 7031472 A	03-02-1995
		NZ 247891 A	26-10-1994
		US 5378623 A	03-01-1995
		US 5538874 A	23-07-1996
		US 5521080 A	28-05-1996
		JP 6062850 A	08-03-1994
WO 9522615 A	24-08-1995	AU 1806795 A	04-09-1995
		CA 2183431 A	24-08-1995
		EP 0746618 A	11-12-1996
		FI 963266 A	21-08-1996
		JP 9509058 T	16-09-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/00081

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N9/16 C12N9/18 C12N1/15 C12P21/02 C11B3/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C12P C11B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	EP 0 808 903 A (ROEHM GMBH) 26. November 1997 siehe das ganze Dokument ---	1-11
P, X	WO 97 05219 A (ROEHM GMBH ; METALLGESELLSCHAFT AG (DE); LOEFFLER FRIDOLIN (DE); PL) 13. Februar 1997 siehe das ganze Dokument ---	12
X	EP 0 575 133 A (SANKYO CO) 22. Dezember 1993 siehe das ganze Dokument ---	1-7, 12, 13
Y		8-11
Y	WO 95 22615 A (NOVONORDISK AS ; SVENDSEN ALLAN (DK); CLAUSEN IB GROTH (DK); OKKELS) 24. August 1995 siehe das ganze Dokument -----	8-11



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

5. Mai 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

25/05/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hillenbrand, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/00081

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0808903 A	26-11-1997	DE 19620649 A	27-11-1997
		AU 1997697 A	27-11-1997
		CA 2205411 A	22-11-1997
WO 9705219 A	13-02-1997	DE 19527274 A	30-01-1997
EP 0575133 A	22-12-1993	AU 667217 B	14-03-1996
		AU 4130893 A	23-12-1993
		CA 2098421 A	17-12-1993
		FI 932758 A	17-12-1993
		IL 106033 A	04-01-1998
		JP 7031472 A	03-02-1995
		NZ 247891 A	26-10-1994
		US 5378623 A	03-01-1995
		US 5538874 A	23-07-1996
		US 5521080 A	28-05-1996
		JP 6062850 A	08-03-1994
WO 9522615 A	24-08-1995	AU 1806795 A	04-09-1995
		CA 2183431 A	24-08-1995
		EP 0746618 A	11-12-1996
		FI 963266 A	21-08-1996
		JP 9509058 T	16-09-1997